

⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑯ Offenlegungsschrift
⑯ DE 3924454 A1

⑯ Aktenzeichen: P 39 24 454.7
⑯ Anmeldetag: 24. 7. 89
⑯ Offenlegungstag: 7. 2. 91

⑯ Int. Cl. 5:
H 01 L 29/28

H 01 L 21/70
H 01 L 21/312
C 07 H 21/04
C 07 K 15/00
G 03 F 1/00

DE 3924454 A1

BEST AVAILABLE COPY

⑯ Anmelder:

Hollenberg, Cornelis P., Prof. Dr., 4000 Düsseldorf,
DE; Mauro, Ernesto di, Prof. Dr., Rom/Roma, IT

⑯ Vertreter:

Grünecker, A., Dipl.-Ing.; Kinkeldey, H., Dipl.-Ing.
Dr.-Ing.; Stockmair, W., Dipl.-Ing. Dr.-Ing. Ae.E. Cal
Tech; Schumann, K., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.; Jakob,
P., Dipl.-Ing.; Bezold, G., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.;
Meister, W., Dipl.-Ing.; Hilgers, H., Dipl.-Ing.;
Meyer-Plath, H., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.; Ehnold, A.,
Dipl.-Ing.; Schüster, T., Dipl.-Phys.; Goldbach, K.,
Dipl.-Ing. Dr.-Ing.; Aufenanger, M., Dipl.-Ing.,
Pat.-Anwälte, 8000 München

⑯ Erfinder:

gleich Anmelder

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Die Anwendung von DNA und DNA-Technologie für die Konstruktion von Netzwerken zur Verwendung in der
Chip-Konstruktion und Chip-Produktion (DNA Chips)

Die Erfindung bezieht sich auf die Anwendung von poly-
meren doppel- oder einzelsträngigen Nukleinsäuren, um
elektronische Netzwerke (DNA-Chips) zu konstruieren und
zu produzieren.

DE 3924454 A1

Beschreibung

Einleitung

DNA ist eine polymere Verbindung, die durch verschiedene physikalische und enzymatische Techniken wie Denaturation/Renaturation, enzymatische Synthese, Modifizierungsreaktionen und Proteinbindung bearbeitet werden kann. DNA-Technologie (Maniatis et al. 1982) ermöglicht die hier beschriebene Konstruktion von selbst-assemblierenden Netzwerken auf ultramikroskopischer oder monomolekularer Ebene. Die Nukleinsäure-Netzwerke können als Masken in photolithographischen Verfahren eingesetzt werden, die heutzutage für die Konstruktion und Produktion von Computerchips in Gebrauch sind. Die Netzwerke können durch die Herstellung eines Abdruckes reproduziert werden, um Replikas herzustellen, die aus anderen Materialien bestehen, oder sie können als Matrize benutzt werden zur Ablagerung andere Materialien wie n-doped Gallium Arsenide oder Gallium Arsenide, die die Fähigkeit haben, elektrischen Strom zu leiten. Die so konstruierten leitfähigen Elemente können als Komponenten elektronischer Chips genutzt werden. Die selbst-assemblierenden Eigenschaften der Nukleinsäuren können auch verwendet werden, um die für elektronische Chips benötigten Schaltelemente zu konstruieren.

I Konstruktion von Nukleinsäure-Netzwerken

1. Konstruktion von Startpunkt (DWIP) und Endpunkt (DWEP) der DNA-Leitung

a. DNA-Leitungsinitiierungspunkt

Ein DWIP, DNA wire-initiation point wird konstruiert mit Hilfe eines DNA-Doppelstranges, der an einem Ende stumpf ist und am anderen Ende eine sequenzspezifische einzelsträngige Verlängerung hat, so daß nur ein Ende das Substrat für DNA-Verlängerung durch Synthese oder Hybridisierung ist. Der DWIP kann durch verschiedene Techniken auf einen festen Träger fixiert werden, wie z. B. durch örtlich fixiert geladene Moleküle oder durch Sequenz-spezifische DNA-bindende Proteine (wie Bakteriophagen-DNA-bindende Proteine, Adenovirus-bindendes Protein, lac-Repressor- oder synthetische DNA-bildende Proteine) oder durch kovalente chemische Bindung.

Um zwei Wachstumspunkte zu erhalten, hat der DWIP zwei sequenzspezifische Einzelstrang-Enden.

Die DNA in dem DWIP kann aus homopolymeren komplementären Strängen bestehen wie polydD-polydG oder polydA-polydT oder aus anderen geeigneten Sequenzen, die Proteine binden oder bessere Fixierungseigenschaften haben.

b. Verlängerung des DWIP

Der DWIP wird durch DNA-Synthese verlängert und/oder durch Hybridisierung eines präsynthetisierten oder natürlichen spezifischen DNA-Stranges einer bestimmten Länge.

c. Konstruktion einer Verbindung zwischen zwei fixierten Punkten. DNA-Leitungspunkt

Der DWEP wird ähnlich konstruiert wie der DWIP.

Die beschriebenen Verlängerungsreaktionen des DWIP können auch für den DWEP benutzt werden und damit zu einer Verbindung zwischen DWIP und DWEP führen. Die Verbindung kann durch Sequenz-spezifische Nukleinsäurehybridisierung hergestellt werden. Die Verlängerung eines DWIP kann alternativ so ausgelegt werden, daß sie direkt mit dem DWEP durch spezifische Hybridisierung eines bestimmten DNA-Strangs verbunden wird.

10 2. Konstruktion von Verzweigungspunkten, Schaltern und mehrsträngigen Regionen zur Benutzung in DNA-Leitungen

15 Die Programmierung der Synthese definierter DNA-Sequenzen, die Verbindung derselben durch sequenzspezifische Hybridisierung und die Schließung der Einzelstrangunterbrechungen in den so erhaltenen Doppelsträngen bieten die Möglichkeit, ein Netzwerk nach Wunsch herzustellen.

20 Beispiel: Die folgenden Konstruktionen sind durchgeführt worden, 1) eines doppelsträngigen DNA-Moleküls, das mit einem einzelsträngig herausragenden poly-C an einem Strang und einem herausragenden polyA an dem anderen Strang endet; 2) eines einzelsträngigen DNA-Moleküls, bestehend aus polyG-polyT-Segmenten (gleichlang mit den herausragenden polyG- und polyA-Strängen der Synthese Nr. 1). Hybridisierung dieser Sequenzen führt zu einem Molekül, das 25 aus zwei doppelsträngigen Enden besteht sowie einer aus zwei DNA-Doppelsträngen gebildeten Schleife (Fig. 1). Die Komplexität des Musters kann nach Wunsch variiert werden. Die sich ergebenden elektrischen Leitungseigenschaften können hiermit in vorprogrammierter Weise festgelegt werden.

3. Definierte DNA-Länge oder Menge

40 DNA steht in bestimmten Mengen, Größen und Zusammensetzungen zur Verfügung, z. B. in Form von Plasmiden, viralen Genome oder synthetischer DNA. Diese Einheiten können für die Konstruktion von DNA-Elementen, wofür eine definierte Menge an DNA in einer definierten Zusammensetzung benötigt wird, benutzt werden. Durch eine an einen spezifischen Punkt gebundene Einheit lassen sich durch die darin enthaltene DNA wünschenswerte Eigenschaften, wie z. B. ein Kontaktspunkt, herstellen.

4. DNA-Proteinkomplexe

45 Spezifische Kombinationen von DNA-Sequenzen und DNA-Bindeproteinen können zur Konstruktion funktioneller Teile eines Netzwerks verwendet werden. Z. B. trägt das Pockenvirus-Genom ein Protein, das spezifisch an das Ende gebunden ist. Dieses Protein kann benutzt werden, um das terminale DNA-Fragment an eine Matrize zu binden. Ferner sind viele spezifisch bindende Regulatorproteine, wie lac-Repressor, λ-Repressor etc., bekannt. Alternativ können Polypeptide synthetisiert werden, die an bestimmte DNA-Sequenzen binden. Auch können modifizierte Nukleotide, die mit spezifischen Antikörpern binden, am Ende eines DNA-Moleküls eingebaut werden.

50 60 65 Spezifische Polypeptid-DNA-Komplexe können benutzt werden, um DNA-Fragmente z. B. auf eine Matrize oder an andere DNA-Moleküle zu fixieren. Zusätzlich oder alternativ können Antikörper benutzt werden,

um DNA-Proteinkomplexe mit anderen Komponenten oder Oberflächen zu verbinden. Auch können DNA-Proteinkomplexe eingesetzt werden, um lokal die Eigenschaften der elektrischen Leitfähigkeit zu verändern.

5. Anwendung der RNA

Sequenzspezifische RNA kann *in vitro* auf programmierten DNA-Matrizen synthetisiert werden. Die Eigenschaften von RNA sind unterschiedlich von jenen der DNA. Ferner kann RNA durch intra-Strang-Hybridisierung jede gewünschte Sekundärstruktur annehmen, z. B. haarnadelähnliche Strukturen, und bietet damit zusätzliche Möglichkeiten, die elektrische Leitfähigkeit zu modulieren. Gemischte RNA-DNA-Netzwerke können auf einfache Weise konstruiert werden durch Programmierung der Reihenfolge der Hybridisierungs-(oder Synthese-)reaktionen, die für die Verbindungs-Konstruktion zwischen DWEP und DWIP verwendet wurden.

6. Beispiele

Beispiel A

Vereinfachtes Protokoll für die physische Orientierung eines DNA-Doppelstranges, der als Matrize, Träger oder Maske für die Konstruktion eines Chips benutzt wird:

Schritt 1: Stelle einen DWIP her mit einem Mikromanipulator auf einer hydrophoben Oberfläche. Bringe mit Hilfe eines Mikromanipulators einen Mikrotropfen einer Lösung des λ -Repressors auf eine hydrophobe Oberfläche wie Polyethylen und lasse ihn anschließend eintrocknen.

Schritt 2: Stelle auf gleiche Weise wie bei Schritt 1 unter Benutzung einer *E. coli*-lac-Repressorlösung einen DWEP 50 μm vom DWIP entfernt her.

Schritt 3: Präpariere ein Plasmid-DNA-Molekül (Maniatis et al. 1982), das an einer Stelle den lac-Operator trägt und in einer Richtung, 165 kb entfernt, den Lambda-Operator.

Dadurch, daß beide Operatoren in jedem gewünschten Abstand innerhalb eines Plasmids integriert werden können, können DNA-Moleküle der erwünschten Länge mit endständigen Operatoren durch Standard-Rekombinant-DNA-Techniken produziert werden. Plasmide geringerer Länge können in *E. coli* repliziert werden. Größere Plasmide können auch als Minichromosomen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* vermehrt werden.

Schritt 4: Behandle die hydrophobe Oberfläche mit einer Lösung dieser DNA. Die DNA wird selektiv und gerichtet an DWIP und DWEP binden.

Beispiel B

Für die Konstruktion kürzerer Verbindungen können Cosmidvektoren benutzt werden. Die Prozedur in Kürze: Linealisiere die Cosmidvektor-DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym. Ligiere mit DNA von etwa 49 Kilobase (ungefähr 15 μm), die an einem Ende einen lac-Operator und am anderen Ende einen λ -Operator enthält. Die Konstruktion dieses DNA-Moleküls erfolgt durch Standard-Rekombinant-DNA-Techniken (Maniatis et al. 1982). Inkubiere die ligierte DNA *in vitro* mit

einer λ -Packaging-Mixtur, transformiere *E. coli*, selektiere und amplifiziere die DNA mit den üblichen Techniken. Benutze diese DNA nach dem in Beispiel A beschriebenen Schema, beginnend mit Schritt 3. Der Abstand zwischen DWIP und DWEP beträgt 15 μm .

Beispiel C

Für längere Verbindungen zwischen DWIP und DWEP kann das *E. coli*-Genom mit spezifisch inserierter lysogener Phagen-DNA oder können durch homologe Rekombination im Chromosom inserierte spezifische DNA-Sequenzen benutzt werden. Längere definierte DNA-Abschnitte können auch in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* durch die Nutzung von Plasmiden (Sherman et al. 1986) oder artifiziellen Chromosomen konstruiert und produziert werden (Burke et al. 1987). Solche DNA-Moleküle tragen jeweils die λ -Operator- und die lac-Operator-DNA-Sequenz in jedem erwünschten Abstand innerhalb der genutzten DNA-Elemente. Die DNA-Moleküle können ein breites Spektrum an Abständen zwischen DWIP und DWEP überbrücken, von einigen wenigen Nukleotiden bis mehr als 1 mm (die Länge des linealisierten *E. coli*-Chromosoms) oder mehrere mm (die Länge von Hefechromosomen). Das einzige Limit wird durch die Zerbrechlichkeit der langen DNA-Moleküle gesetzt. Benutze die hergestellten DNA-Moleküle wie in Beispiel A, beginnend mit Schritt 3.

30 Literatur

Burke D. T., Carle G. F. and M. V. Olsen, *Science*, 236 (806–812), 1987.
 Maniatis T., Fritsch E. F. und J. Sambrook, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, USA, 1982.
 Sherman F., Fink G. R. and J. B. Hicks, *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratories, USA, 1986.

40 II Die Umsetzung des Nukleinsäure- oder Nukleinsäure-Proteinnetzwerks in ein elektrizität-leitendes Netzwerk

Die DNA Netzwerke können als Matrize oder Gerüst benutzt werden, um Replikas zu produzieren, die aus anderen Materialien bestehen. Die Replikas können in Form von MOSFETs ausgelegt werden (metal oxid semiconductor field effect transistors, Metalloxydhalbleiterfeldeffekttransistor), MESFETs (metal semiconductor FETs; Metallhalbleiter-FETs) und MODFETs (modulation FETs; Modulierungs-FETs) durch Ablagerung verschiedener Materialien in bestimmter Abfolge.

45 A) Anwendung der shadowing-Technik (Schattierungstechnik) zur Ablagerung des Leiters. Das Bauprinzip (siehe Fig. 2) basiert auf der Konstruktion eines molekularen Nukleinsäure-Protein-Netzwerks auf einem Träger A oder einem Substrat A mit definierten chemischen Eigenschaften, die die Durchführung folgender Schritte erlauben:

50 1) Beschattete (unter niedrigem Winkel) das Netzwerk mit Substanz B unter Benutzung der Techniken, die heute für die Präparierung von DNA für Elektronenmikroskopie eingesetzt werden, die zu einem nicht abgedeckten Streifen entlang der DNA führen.
 2) a) Lagere dem Träger eine Schicht der Substanz C, z. B. doped Gallium Arsenide, doped

Silicium oder einen ähnlichen Leiter, durch metalloorganische chemische Verdampfung (MOCVD, metallo organic chemical vapour deposition) auf.

b. Lagere Substanz C durch elektrische Ablagerung nur auf dem Streifen entlang des Nukleinsäure-Netzwerks.

3) Entferne Substanz B und die DNA, so daß das Leiternetz frei bleibt.

4) Lagere einen zweiten Leiter D, z. B. Gallium Arsenide, auf.

5) Falls erwünscht, entferne Substanz A und 10 ersetze sie durch einen anderen Träger, Material E.

Dieses Verfahren führt zum Austausch des 15 molekularen Nukleinsäureprotein-Netzwerks mit dem Leiter C, eingebettet in Leiter D.

B) Alternativ kann der Leiter C direkt auf dem Nukleinsäure-Netzwerk abgelagert werden. Fahre 20 weiter fort mit Schritt 5.

III Photolithographische Reproduktionsmethode, wobei das DNA-Netzwerk als Maske benutzt wird

In der Standardprozedur der Produktion von mikroelektronischen Netzwerken werden die Netzwerke in vergrößerter Form angefertigt und dann fotografisch verkleinert auf das Chip gebracht. In diesen Standardprozeduren wird ein Netzwerk entworfen und benutzt, um ein Set von Master-Masken in Endgröße herzustellen, die dann auf den Chips reproduziert werden. Die DNA-Netzwerke können direkt als Master-Maske für die Produktion der mikroelektronischen Netzwerke verwendet werden, wodurch Größe-reduzierende Zwischenstufen vermieden werden. Das heißt, die DNA- oder die DNA-Protein-Netzwerke können direkt beim Schritt der photolithographischen Prozedur als Fotomasken verwendet werden, wobei die oxidierte Wabe (Siliciumdioxid oder ähnliche Verbindungen), mit einer Schicht lichtempfindlichen Materials bedeckt, dem UV-Licht durch die Photomasken ausgesetzt wird (in diesem Fall durch die DNA). Auch hier kann das Netzwerk durch Ablagerung oder Umwandlung, wie unter II beschrieben, in einem Netzwerk aus einem anderen Material überführt werden.

45

verzweigte Stellen sowie (4) spezifische Verbindungsstellen.

5. Verfahren, das die Abfolge von DNA- oder RNA-Synthesereaktionen und die Abfolge der Einbauten von vorsynthetisierten Nukleinsäurekomponenten zur Konstruktion elektronischer Netzwerke benutzt.

6. Verfahren, das die in den Claims 3 – 5 beschriebenen Materialien für die Konstruktion und Produktion von Chips für die Mikroelektronik verwendet.

7. Verfahren, das DNA und/oder RNA, komplexiert mit Liganden wie Metall-Ionen, Interkalatoren oder Proteinen, als elektrischen Leiter benutzt.

8. Verfahren, das vorgefertigte Elemente benutzt zur Konstruktion spezifischer Teile des Netzwerkes und zum Einbau in das Netzwerk durch spezifische Hybridisierung.

9. Verfahren, das spezifische Hybridisierung zum Einbau von vorgefertigten Netzwerken in definierten Verbindungspunkten anwendet.

10. Verfahren, das eines der in den Claims 1 – 9 beschriebenen Netzwerke aus DNA, DNA-Protein, DNA/RNA oder DNA/RNA/Protein zur Konstruktion einer Matrize oder eines Gerüsts für die Produktion von Netzwerken benutzt, die aus anderen Materialien bestehen, vorzugsweise aus Gallium Arsenide oder n-doped Gallium Arsenide.

11. Verfahren, das eines der in den Claims 1 – 9 beschriebenen Netzwerke aus DNA, DNA-Protein, DNA/RNA oder DNA/RNA/Protein als Maske oder für die Konstruktion einer Maske zur Produktion von Computerchips durch photolithographische Prozeduren benutzt.

12. Verfahren, das spezifische Komplexe von DNA oder DNA/RNA oder DNA/RNA/Proteinen oder DNA/Proteinen oder RNA/Proteinen zur Konstruktion von Netzwerken benutzt, die als Masken für die Produktion von Computerchips durch photolithographische Prozeduren gebraucht werden.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

Patentansprüche

1. Die Anwendung von polymeren doppel- oder 50 einzelsträngigen Nukleinsäuren, um elektronische Netzwerke (DNA-chips) zu konstruieren und zu produzieren.

2. Die Anwendung von DNA- und/oder RNA-Doppel- oder Einzelsträngen zur Konstruktion und zur Produktion elektronischer Netzwerke.

3. Verfahren für Entwurf, Konstruktion und Produktion elektronischer Netzwerke unter Benutzung von doppel- oder einzelsträngiger DNA, doppel- oder einzelsträngiger RNA und spezifisch DSNA-bindender Proteine, jede Substanz einzeln 60 oder in Kombination.

4. Verfahren, das DNA- und RNA-Synthese und Modifizierungsreaktionen für die Konstruktion und Produktion eines Netzwerks benutzt, das (1) eine definierte Orientierung (Anfangs- und Endpunkt) hat, (2) spezifische einzelsträngige Regionen, die durch Position, Länge und Sequenzzusammensetzung definiert werden, und (3) mehrfach

55

65

BEST AVAILABLE COPY

— Leerseite —

THIS PAGE BLANK (USPTO)

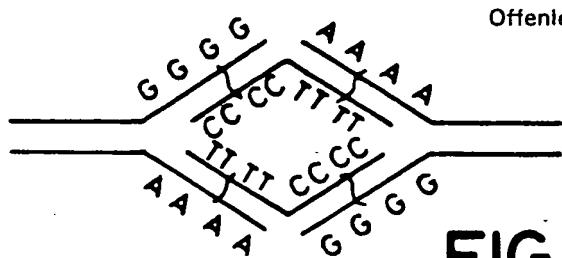


FIG.1

BEST AVAILABLE COPY

DNA - STRANG

FIG.2

